

フェレットを用いた形成期の大脳皮質における神経線維層の解析

著者	齋藤 健吾
著者別表示	Saito Kengo
雑誌名	金沢大学十全医学会雑誌
巻	128
号	2
ページ	48-49
発行年	2019-07
URL	http://doi.org/10.24517/00055878



【要約】

修士課程優秀論文

フェレットを用いた形成期の脳皮質における神経線維層の解析

Investigation of fiber layers in the developing cerebral cortex using ferrets

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 脳神経医学

齋 藤 健 吾

【はじめに】

大脳皮質は高次脳機能の中枢であり脳神経系のなかでも特に重要であることから、その形成や進化のプロセスおよび疾患病態の解明は脳神経医学の最重要課題の一つである。ヒトやサルなどの高等哺乳動物の形成期の脳皮質では、神経前駆細胞は脳室帯 (ventricular zone, VZ) と脳室下帯 (subventricular zone, SVZ) に存在する。VZには放射状グリアと呼ばれる幹細胞が存在し、複数の細胞分裂を経てSVZの神経前駆細胞を産生する。SVZは内側線維層 (inner fiber layer, IFL) と呼ばれる線維層によって分断され、IFLの内側にあるinner SVZ (ISVZ) と外側にあるouter SVZ (OSVZ) に分かれる。OSVZのさらに外側には別の線維層である外側線維層 (outer fiber layer, OFL) が走る。

これまでに大脳皮質形成期の神経前駆細胞については詳しく研究されてきたが、IFLやOFLなどの神経線維層についてはあまり解析されてこなかった。また、これらに対応する神経線維層はマウスでは見つかっていなかったことから、大脳皮質の進化の観点からもこれらの神経線維層は注目を集めていた¹⁾。

子宮内電気穿孔法は大脳皮質へ遺伝子導入を行うことができる有用な手法である。子宮内電気穿孔法によって大脳皮質の神経細胞にGFPを導入すると、GFP陽性の神経線維が標識され、その投射経路や由来を明らかにすることが可能である。我々は脳皮質が発達した食肉類哺乳動物フェレット (図1) を用いることにより、これらの

神経線維層の解析が可能になると考えた。そこで、我々が世界に先駆けて成功したフェレット大脳皮質への子宮内電気穿孔法^{2,3)}を用いて、フェレットにおける神経線維層の解析を行ったところ、IFL様の神経線維がフェレットの大脳皮質にも存在することを以前に発見していた⁴⁾。本研究では子宮内電気穿孔法を用いてフェレットの大脳皮質にGFPを導入し、IFLやOFLなどの神経線維層の発達過程、細胞起源、投射先、進化過程について検討を行った。

【結果】

フェレットの形成期の脳皮質にもIFLとOFLが存在する

ヒトやサルの形成期大脳皮質にはIFLとOFLが見いだされていたが、フェレットに存在するかは不明であった。子宮内電気穿孔法を用いてフェレットの形成期大脳皮質の神経細胞にGFPを導入し、大脳皮質由来の神経線維を可視化した結果、IFLやOFLに対応する神経線維層がフェレットにも存在することを見いだした (図2)。さらにこの結果は、IFLとOFLは大脳皮質由来の神経線維を含んでいることを意味しており、IFLおよびOFLの神経線維の由来の一部が明らかとなった。

IFLとOFLの発達過程

次にIFLとOFLの発達過程を調べるため、子宮内電気穿孔法を用いてGFPを導入し、異なる時期にサンプリングを行った。その結果、IFLは出生後0日にすでに形成されていた。一方で、OFLは出生後0日にはほとんど存在せず、出生後6日目で明瞭に観察された。加えて、出生後16日目ではOFLが更に増加していた。従って、IFLはOFLよりも早い時期に形成されることが明らかとなった。

IFLとOFLの細胞起源

IFLとOFLの細胞起源を明らかにするため、異なる時期に子宮内電気穿孔法を行ってGFPを大脳皮質の上層あるいは下層の神経細胞に導入した。その結果、どちらの場合もGFP陽性のIFLとOFLが見られた。従って、上層、下層の神経細胞のいずれからでもIFLとOFLへ軸索が送られていることが分かった。異なる神経細胞からそれぞれIFLとOFLへ軸索を送っているのか、もしくは同一の神経細胞からの軸索が枝分かれしてIFLとOFLの両者に行くのか今後の解析が必要である。

IFLとOFLの投射経路

IFLとOFLの投射経路を調べるため、導入したGFPを



図1. 食肉類哺乳動物フェレットの外観。

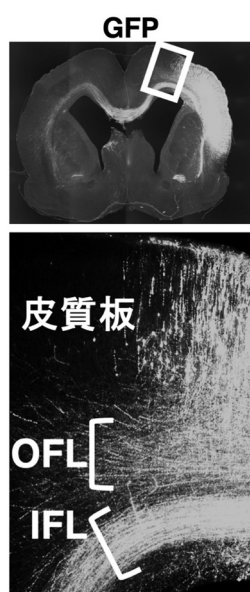


図2. ヒトやサルに存在するOFLやIFLが、フェレットにも存在した。

(上) 大脳皮質神経細胞にGFPを導入したフェレットの大脳皮質の冠状断切片。(下) 上段の四角部分の拡大図。GFP陽性のOFLとIFLが見られた。

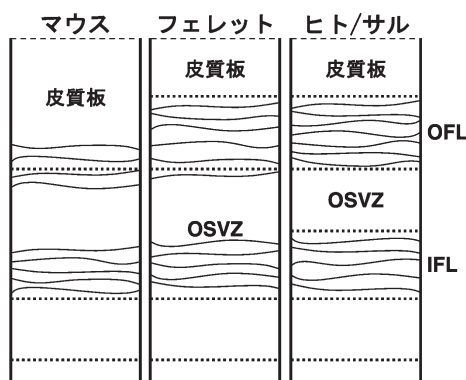


図3. 様々な哺乳動物の神経線維の模式図。

指標にして、IFLとOFLに含まれる神経線維の投射先を解析した。その結果、IFLの神経線維は対側大脳皮質や皮質下へ、OFLは隣接する大脳皮質領域へ投射していることを見いだした。この結果は、IFLとOFLに含まれる神経線維は異なる役割を持つことを示唆している。

フェレットとマウスの神経線維の比較

IFLやOFLはマウスに見られないとされていたが本当に存在しないのか解析するために、フェレットと同様の子宮内電気穿孔法の実験をマウスで行った。その結果、驚くべきことにマウスにおいてもIFL、OFLと同様の投射経路をもつ神経線維が存在することが分かった。従って、IFLとOFLは様々な哺乳動物種に保存されている可能性が高い(図3)。またマウスではOFLがフェレットよりも著しく少なかったことから、OFLが高等哺乳動物では増加しており、脳機能の発達に関与している可能性が示唆された。

【考察】

本研究では、フェレットの大脳皮質への遺伝子導入技術を駆使することにより、フェレットにもIFLとOFLが存在することを見だし(図2)、さらにその発達過程や、細胞起源、投射先を明らかにした。従来、IFLとOFLに対応する神経線維層はマウスでは見いだされていなかったが、本研究の結果、IFLやOFLはマウスを含む哺乳動物で幅広く保存されていることが示唆された。さらにフェレットとマウスを比較した結果、OFLが進化的に増加していることを見だし、大脳皮質の機能的な発達にOFLの増加が重要である可能性を提示した(図3)。今後の課題として、IFLやOFLの異常がどのような疾患病態と関連するか解析することが重要である。

【結語】

フェレットとマウスの大脳皮質を用いた本研究により、これまで解析が困難だった形成期大脳皮質の神経線維層の発達過程、細胞起源、投射経路、さらには進化プロセスを明らかになった。これらの結果は、高等哺乳動物の大脳皮質における神経線維層の機能的役割の理解、疾患病態との関連の解明につながる事が期待される。

本研究成果は国際英文学術誌Cerebral Cortexに受理された⁵⁾。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました脳神経医学分野の河崎洋志教授に心より厚く御礼申し上げます。

また、ご指導、ご助言を頂きました脳神経医学分野の研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Molnar Z. and Clowry G., Cerebral cortical development in rodents and primates, *Progress in Brain Research*, 195, 45-70, 2012
- 2) Kawasaki H., Iwai L. and Tanno K., Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using in utero electroporation, *Molecular Brain*, 5, 24, 2012
- 3) Shinmyo Y., Terashita Y., Dinh Duong T. A., Horiike T., Kawasumi M., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H., Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals, *Cell Reports*, 20, 2131-2143, 2017
- 4) Kawasaki H., Toda T. and Tanno K., In vivo genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using in utero electroporation, *Biology Open*, 2, 95-100, 2013
- 5) Saito K., Mizuguchi K., Horiike T., Dinh Duong T. A., Shinmyo Y. and Kawasaki H., Characterization of the inner and outer fiber layers in the developing cerebral cortex of gyrencephalic ferrets, *Cerebral Cortex*, in press



Profile

2017年3月 鳥取大学医学部生命科学科卒業
2019年3月 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 修士課程 修了
2019年4月～ 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 博士課程 在籍中